酸筍發酵過程中綠色斑點產生之探討與防治

鄭大青[1] 賴珊湖[1] 蔡維鐘[1] 黃錦城[2] 王西華[2]
1 食品工業發展研究所
2 國立台灣大學農業化學研究所

摘要：酸筍在發酵過程中，於筍節處發現有綠色斑點之產生，此綠色斑點經微生物分離、純化及接種，確認爲黴菌污染所造成。此株黴菌經形態、生理與DNA之分析，鑑定結果爲 *Aspergillus versicolor*。分離株 *Aspergillus versicolor* 在好氣、微好氣環境下生長良好，但在嫌氣環境下則被抑制。而乳酸濃度在2.0%以上才具有顯著抑制效果。因此爲了防止竹筍發酵時 *Aspergillus versicolor* 生長所造成的綠斑，發酵時應保持嫌氣狀態，並用重石加壓，以提供乳酸菌生長所需環境，並抑制黴菌生長，以利於特殊的乳酸發酵風味之產生，此外應將發酵用的竹籠容器改爲塑膠桶，使發酵酸液容易保持於發酵槽內，更易造成嫌氣狀態。

關鍵字:酸筍、乳酸發酵

前　　言

酸筍是台灣的特產之一，它是以長約90公分的麻竹筍 *(Dendrocalamus latiflorus)*爲原料，經過截切、殺菁、發酵等過程製成。由於酸筍是以天然的乳酸菌作無鹽的乳酸發酵，有些地區採乾式發酵，即在發酵槽(竹籠)發酵時，讓發酵液流出；而有些地區採浸漬發酵，讓發酵液保留在發酵槽內 (黃，1985)。以竹籠發酵時，業者常發現發酵過程或完成時，上層的酸筍筍節處發現有綠色斑點產生，此綠斑常引起消費者的疑慮，故本實驗乃探討發生綠色斑點的原因、並採取防治措施，以提高酸筍的品質，確保消費者食用安全。

材料與方法

一、材料：

試驗材料由嘉義一家生產酸筍的業者所提供之筍節處有綠斑的酸筍及採收生鮮的麻竹筍。

二、試驗方法

(一)酸筍筍節上綠色斑點之鏡檢

將酸筍筍節上的綠色斑點(圖1)取出，直接在位相差顯微鏡(OPTIPHOT- 2，Nikon)下觀察照相。

(二)酸筍筍節綠色斑點之微生物分離

將酸筍筍節之綠色斑點以無菌刀片切割後，直接將其放在含 40ppm 的 Streptomycin 之 PDA (potato dextrose agar)平板上，放置室溫5-7天。

(三)黴菌孢子懸浮液(Sharma,1990)

將黴菌塗抹於PDA平板，培養於室溫(26-28℃)下10天，再加入10mL含0.1%Tween 80 之無菌水後，將分生孢子(conidia)收集，以5000xg離心20分鐘後，以無菌水清洗，重覆三次，再以滅過菌的多層紗布過濾之，製成孢子懸浮液，然後稀釋成10^6spores/mL，備用。

㈣確認分離微生物是否為造成綠斑之微生物

將業者當天所採割之麻竹筍帶回實驗室，經截切後，以沸水殺菁一小時，取出以風扇吹風冷卻，再將其分裝於無菌的petri dish(直徑為15cm)內，分成二組，一組為對照組，不接菌；另一組為實驗組，將製備好的菌體懸浮液，以無菌針筒注射入竹筍之各部位。蓋上蓋子，將其密封，並以鋁箔紙包裹避免見光，進行室溫發酵。

㈤菌種鑑定

1. 傳統形態、生理鑑定

將已純化的菌株接種於 Malt Extract Agar (MEA；malt extract 20g,dextrose 20g, peptone 1.0g, agar 20g, distilled water 1.0L) 在25℃培養，定期觀察其有性孢子及無性孢子之發生過程，以鑑定屬名(von Arx,1970)。再將含有0.05%Tween 20的0.2% agar水溶液，分別以5.0mL分裝於試管中滅菌，然後加入少許培養於 Czapek's agar(CZA；$NaNO_3$ 3g,K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, KCl 0.5g, sucrose 30g, agar 15g, distilled water 1.0L)斜面上5-7天的受測菌株分生孢子，混合均勻後，以無菌接種環沾之，再將其接種於鑑定培養基：Czapek Yeast Extract Agar(CYA；$NaNO_3$ 3g,K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, KCl 0.5 g, sucrose 30g, yeast extract 5.0g, agar 15g, distilled water 1.0L)，MEA，及25% Glycerol Nitrate Agar (G25N；$NaNO_3$ 2.25g , K_2HPO_4 0.75g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.375g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.075g, KCl 0.375g, glycerol 250g, yeast extract 3.7g, agar 12g, distilled water 1.0L)，於25℃培養一星期。量測菌株於不同鑑定培養基中生長一星期之菌落直徑；分生孢子頭(conidial head)的顏色、形狀及大小；柄(stipe)之長度、直徑、外壁之厚薄及是否平滑；囊泡(vesicle)之形狀；瓶梗(phialide)、小梗(metula)之大小；分生孢子(conidium)之形狀、大小及表面。以上述特徵以Raper等人(1965) 鑑定體系為主，及以Klich 及Pitt (1988)之鑑定體系為輔，鑑定種名。

2.分子生物法鑑定

⑴菌種來源

所有眞菌菌株購自食品工業發展研究所之菌種中心，包括：*Aspergillus orgzae* CCRC 30118、*Aspergillus fumigatus* CCRC 30502、*Aspergillus flavus* CCRC 30006、*Aspergillus japonicus* CCRC 30022、*Aspergillus japonicus* CCRC 32209、*Aspergillus niger* CCRC 30001、*Aspergillus versicolor* CCRC 32142、*Aspergillus versicolor* CCRC 30225、*Aspergillus versicolor* CCRC 31488、*Candida versatilis* CCRC 21627、*Saccharomyces cerevisiae* CCRC 20271、*Zygosaccharomyces suomiensis* CCRC 22226，以及分離自綠斑酸筍之黴菌。

⑵DNA的抽取

*Aspergillus*屬之DNA抽取，按Chow & Kafer(1993)之方法，將菌絲收集過濾後，懸浮於0.2M Tris-HCl(pH 7.5)，0.5M NaCl，0.01M EDTA和1%SDS溶液裡，再以0.3-0.4 micro玻璃珠，加入phenol：chloroform(1:1, v/v)，於振盪器上劇烈振盪6分鐘，再加入緩衝溶液和phenol：chloroform，重覆二次，混合液經離心後，取下層液以95%酒精(-20℃)，離心5分鐘，再以70%酒精清洗，眞空乾燥後加入100uL殺菌過的蒸餾水，以作為PCR之模版。

酵母菌菌種DNA之抽取，按Holm等(1986)之方法將菌體懸浮在SCE buffer中，添加Novozyme 234，保溫之菌體變成原生質體(spheroplast)為止,離心,菌體加入1mL GuCl(Guanidinium chloride)溶液，用吸管上下抽送，直到形成均勻菌體懸浮液，將菌液保溫於65℃/10分鐘，加入已預冷(-20℃)酒精1mL，離心，完全倒去澄清液，各離心管加入1mL(10X) TE(10mM Tris-HCl，1mM EDTA)緩衝溶液，於菌液中加入10uL RNase，在37℃保溫一小時，再加入 10uL proteinase K，於65℃保溫30分鐘，加入 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)混合液1mL，以抽取DNA，離心，抽取上層澄清液，加入等體積預冷之2-propanol 1mL，絲狀物質形成沉澱物，倒去液體，以預冷之酒精(70%)洗二次，並以眞空乾燥後，再以0.4mL

TE buffer溶解，以作爲PCR模版。

⑶PCR放大

由於眞核在核醣體RNA基因上有許多重覆，且18S，5.8S和26S核醣體RNA基因上的核苷酸序列具高度保守性，其中以插入間隔(inter transcribed spacer,ITS)隔開，因此以White等人(1990)所使用對眞菌具有的一對引子ITS1和ITS2，其中ITS1位於18S rRNA終點的19個核苷酸序列，5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'，ITS2位於5.8S rRNA起始點的20個核苷酸序列5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'(如圖2)，將抽取之DNA稀釋至40ng/uL，10uL的眞菌DNA抽出液加入10uL的緩衝溶液(100mM Tris.HCl(pH 8.3，25℃)，500mM KCl，15mM MgCl2，0.01 %gelatin)，各2uL的各種dNTP，各5uL的約20個鹽基的各種primers和61.5uL的去離子水，2.5 unit DNA polymerase 0.5uL，混合液於95℃加熱3分鐘將雙股DNA去活化，然後在94℃/1min，62℃/1min，72℃/1min處理，共40循環，最後步驟於72℃維持5分鐘。

⑷電泳與影像分

PCR產品取5uL，與1uL的loading buffer混合，於1.4%agarose之電泳中(Mupid II，50V，60分鐘)進行分析，然後以UV影像分析儀(Alpha. Innotech Corproation，IS-1000 Digital Imaging System)照相。

⑸PCR產品之分子量

以GIBCO BRL(15628-019)100bp DNA ladder進行分析，其具有100至1500之base pairs(bp)。

㈤分離黴菌的生長特性

1.氧氣需求的影響

以無菌接種環勾取黴菌菌落，直接畫線於PDA平板上，分別培養於室溫下之好氣環境(大氣中的氧氣含量約爲19-21%)；以及二個放入嫌氣瓶(Merck)中，一個嫌氣瓶內放入anaerocult A(Merck)嫌氣包(約在30分鐘內，氧氣含量低於2%，而二氧化碳已達16%，持續至50分鐘氧氣幾乎已到達零的環境)作爲嫌氣的環境；另一個嫌氣瓶內放入anaerocult C(Merck)微好氧包(約30分鐘便能達到氧氣及二養化碳含量皆爲8%的環境)，達成微好氧的環境。一星期後觀察生長情形。

2.乳酸濃度對其生長的影響

添加不同濃度無菌的乳酸於PDA培養基，使其最終濃度爲0、0.1%、0.2%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%(El-Gazzar,1987)，作成平板，每個平板滴入0.05mL的10^6spores/mL孢子懸浮液，待其乾後，置於室溫下培養5-7天，觀察結果。

結　果

一、酸筍筍節上的綠斑

酸筍在發酵過程中，偶而發現筍節處會有綠色斑點的產生，撕開後可看到沿著筍節產生綠色斑點，將綠色斑點取出，以位相差顯微鏡觀察，發現疑似黴菌菌絲，經過分離、純化培養，確認爲黴菌，將其接種回未發酵的麻竹筍內，經發酵15天之後，此分離黴菌會在筍節處產生綠色斑點(圖3)，故此分離黴菌即爲造成酸筍綠色斑點的微生物。

二、菌種鑑定

㈠傳統形態特徵

將測定的菌株培養於三種不同培養基中，經過一星期後，其菌落直徑分別爲CYA中23-24mm、MEA/14-16mm、G25N/9-11.5mm，菌絲皆呈白色；不會產生游孢子(zoospore)或黏菌變形體；菌絲具橫隔(septem)，無扣子體(clamp connection)；不具有性世代；不會產生分生孢子器(pycnidium)；

及分生孢子盤(acervulium)，分生孢子小於20um，爲單細胞鏈狀排列；產孢細胞爲瓶梗(phialide)，無色，著生於分生孢子柄，且排列緊密，由此可鑑定爲*Aspergillus*屬。此外，具有小梗(metula)，分生孢子頭(conidial head)爲綠色，放射狀，分生孢子柄長度大於300um，在G25N培養時，不產生閉囊殼(cleistotheicum)，根據這些特徵鑑定爲*Aspergillus versicolor*。

(二)分子生物學鑑定法

以聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)增殖眞菌的核醣體18S-5.8S之插入間隔的DNA片段，結果如圖4所示，lane 1、2、3和8各爲*Aspergillus oryzae* CCRC 30118，*A. fumigatus* CCRC 30502，*A. niger* CCRC 30001，*A. flavus* CCRC 30006四株菌，皆無法以ITS1和ITS2增殖出此段DNA片段。而lane 4、5、9爲三株*Aspergillus versicolor*不同菌株，其放大的DNA片段則與分離鑑定菌株(lane 6)有相同的DNA片段，與marker DNA 比對，此片段長度(含兩端primer)約爲220bps，而另外lane 7、11爲*Aspergillus japonicus*(lane 7和10爲相同菌株)，其增殖的DNA片段長度爲240bps，至於lane 12爲酵母菌*Zygosaccharomyces suomiensis* CCRC 22226，片段爲160bps，lane 13爲酵母菌*Candida versatilis* CCRC 21627，其片段爲200bps，lane 14爲酵母菌*Saccharomyces cerevisae* CCRC 20271, 其片段長度爲460bps。

三、分離黴菌的生長特性

將分離之黴菌接種於PDA上，分別培養於好氣、微好氣、嫌氣環境下，經過一星期室溫培養後，發現在嫌氣環境未發現生長，而好氣、及微好氣下皆生長良好，但將培養嫌氣之平板放置於好氣環境時，結果生長良好，故得知，嫌氣能抑制此黴菌的生長。

此分離菌株在不同濃度的乳酸含量下的生長情形，結果如表1所示，添加的乳酸濃度爲0.5%時稍具抑制效果，此時pH 爲3.7，與酸筍發酵後之pH 3.6相近，而以2.0%以上才具較好的抑制效果，此結果也顯示出此黴菌耐酸能力很強，在pH 2.5仍能生長。

表 1. 培養基上含不同濃度之乳酸對綠斑微生物生長之影響

Table 1. Effect on different concentration of lactic acid on the growth of *Aspergillus versicolor* in potato dextrose agar.

	培養基中乳酸濃度 (%)						
	0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0
培養基之pH 值	5.5	5.1	4.2	3.7	2.8	2.5	2.0
綠斑微生物生長情形	+++	+++	+++	++	+	+	-

"+++" ：25℃/7天，菌落直徑爲>30mm

"++" ：25℃/7天，菌落直徑爲>10-20mm

"+" ：25℃/7天，菌落直徑爲>10mm

"-" ：不生長

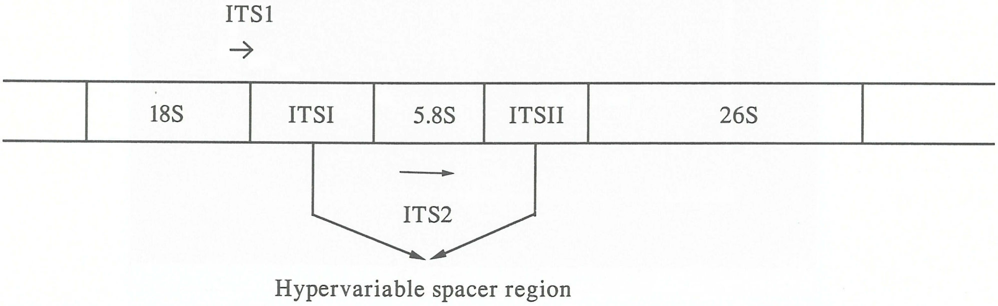
討　論

經由微生物分離、純化、確認後，此酸筍綠斑微生物爲*Aspergillus versicolor*，此黴菌之生長在嫌氣下能完全被抑制，但酸或低pH的抑制效果並不顯著，當酸筍發酵時如能浸漬於發酵的酸液裡，有助於達到嫌氣狀態，故爲了防治酸筍在發酵過程中綠色斑點的產生，首先將傳統乾式竹籠發酵改爲塑膠

桶發酵槽，以保留發酵時所產生的酸液，由於乾式發酵與浸漬發酵對酸筍品質影響不大(黃，1985)，故此法可採行。此外加壓重石以去除殘留於竹筍裡的空氣，以達到較好的嫌氣效果，如此也能達到防治措施。

圖 1. 酸筍在發酵過程中，在筍節處發現有綠色斑點

Fig 1. Green spots are sometimes found during fermentation of bamboo shoots.



ITS1:5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

ITS2:5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'

ITSI 、ITSII:internal transcribed spacer

圖 2. 真菌DNA上轉錄rRNA之18S－5.8S rRNA之位置及其上保守基因作成的一對引子位置

Fig 2. Schematic representation of an rRNA operon showing the approximate priming sites for the PCR amplification of the 18-5.8S region in the fungal rDNA unit.

圖 3. 接種*Aspergillus versicolor*的竹筍，經15天發酵後發現筍節處出現綠色斑點

Fig 3. Green spots are found after 15 days fermentation of bamboo shoots inoculated *Aspergillus versicolor.*

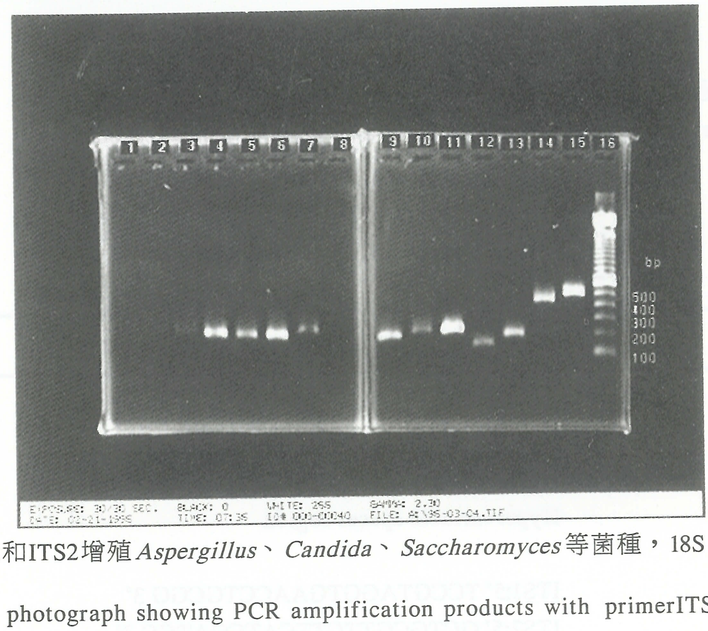


圖 4. 以引子ITS1和ITS2增殖*Aspergillus*、*Candida*、*Saccharomyces*等菌種，18S－5.8S rRNA基因之DNA片段

Fig 4. Composite photograph showing PCR amplification products with primerITS1 and ITS2 for the following fungi.

lane 1: *Aspergillus oryzae* CCRC 30118；lane 2: A. fumigatus CCRC 30502；lane 3: *A. niger* CCRC 30001；lane 4: *A. versicolor* CCRC 32142；lane 5: *A. versicolor* CCRC 30225；lane 6: isolated from fermentated bamboo shoots；lane 7,10: *A. japonicus* CCRC 32209；lane 8: *A. flavus* CCRC 30006；lane 9: *A. versicolor* CCRC 31488；lane 11: *A. japonicus* CCRC 30022；lane 12: *Zagosaccharomyces suomiensis* CCRC 22226；lane 13: *Candida versatilis* CCRC 21627；lane 14: *Saccharomyces cerevisiae* CCRC 20271；lane 15: 500 bp nucleotide target segment；lane 16:Molecular weight 100bp DNA ladder marker.

誌　謝

本研究承蒙農委會(83農建-3.5-糧-02(1))經費補助，特致謝意。

參考文獻

1.中央標準局。1991。中國國家標準,總號 12925, N6233。食品微生物之檢驗法－黴菌及酵母菌之檢驗 經濟部中央標準局。

2.黃錦城、陳文亮、江伯源。1985。筍干品質改進之研究。食品工業發展研究所研究報告第198號

3.Chow, T. Y. K. and E. Kafer. 1993. A rapid method for isolated of total nucleic acids from *Aspergillus nidulans.* Fungal Genetics Newsletter. 40:25-26.

4.El-Gazzar, F. E., G. Rusul and E. H. Marth. 1987. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of lactic acid and at different initial pH value. Journal of Food Protection. 50(11):940-944.

5.Holm, G., D. W. Meeks-Wagner, W. L. Fangman, and D. Botstein. 1986. A rapid efficient method for isolating DNA from yeast. Gene. 42:169-173.

6.Klich, M. A. and J. I. Pitt. 1988. A laboratory guide to common by *Aspergillus parasiticus* specices and their teleomorphs. CSIRO, Division of Food Processing, North Ryode, p116.

7.Raper, K. B. and D. I. Fennll. 1965. The genus *Aspergillus.* Williams &Wilkins, Baltimore, p686.

8.Sharma, A., S. R. Padwal-Desal, and P. M. Nair. 1990. Aflatoxin-producing ability of spores of by *Aspergillus parasiticus* exposed to gamma radiation. Journal of Food Science. 55(1):275-276.

9.von Arx, J. A. 1970. The genera of fungi sporulating in pure culture. Verlag von J. Cramer, Lehre, p288.

10.White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p315-322. In:Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White(ed.), PCR protocols. Acadeemic Press, Inc., San Diego, California.

Study on the Prevention of Green Spot Formed during the Fermentation of Bamboo Shoots.

T. C. Cheng[1], S. H. Lai[1], and W.C. Tsai[1]
C. C. Huang[2], and H. H. Wang[2]
[1] Food Industry Research and Development Institute
[2] Graduate Institute of Agricultural Chemistry, Nationa Taiwan University

Abstract

The green spots of fermentated bamboo shoots was caused by contaminating fungus. The fungal species were isolated and identified to be *Aspergillus versicolor* by morphological, physiological and molecular biological method. *Aspergillus versicolor* can grow under aerobic and microaerobic conditions, whereas under anaerobic condition, the growth of the fungus is inhibited. In addition, lactic acid with concentrations higher than 2% can strongly inhibit the growth of the microorganism. For these reasons, bamboo shoot should be kept under anaerobic condition during fermentation by putting heavy stones on top of the basket; this would favor the growth of lactic acid bacteria to produce typical flavors and at the same time prevent the fungal growth. Furthermore, instead of bamboo baskets, plastic baskets are recommended as containers during the fermentation process to keep under the anaerobic condition.

Key words : fermentated bamboo shoot, lactic acid fermentation, *Aspergillus versicolor*